Münster i/W. 1934. Nº 61

Phil. Diss.

Botanik.

Weitere Beiträge zur Symbiose von Azolla und Anabaena.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde einer Hohen Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. Westf.

vorgelegt von

Luise Wildemann

aus Münster i. Westf.

Gedruckt in der Dissertations-Druckerei Heinr. & J. Lechte, Emsdetten

1934

Dekan: Prof. Dr. Ley
Referent: Prof. Dr. Hannig
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1933.

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung.

II. A. Wachstumsbeobachtungen an Klonen.
B. Vergleich verschiedener natürlicher Nährböden.
C. Wachstum auf verschiedenen mineralischen Nährlösungen.
D. Wachstumsversuche mit verschiedenen ph-Werten der Molisch'schen Nährlösung und mit verschiedenen Konzentrationen der Molisch'schen, der Sachs'schen und der von der Crone'schen Nährlösung.
E. Versuch über etwaige gegenseitige Beeinflussung von anabaenahaltigen und anabaenafreien Azollen in demselben Kulturgefäß.
F. Versuche durch Kultur auf N-freier Nährlösung anabaenafreie Pflanzen zu erhalten.
G. Kulturen im Sommer.

III. Beobachtungen über die Fruktifikation.

IV. A. Untersuchungen über das Wachstum von Anabaena unter verschiedenen Kulturbedingungen.
B. Reinkulturen von Anabaena.

V. Versuche anabaenafreie Azollen künstlich mit Anabaena zu infizieren.

VI. Versuche über Neuinfektion im Freien.

Zusammenfassung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555426_0245

I.

Einleitung.

Anschließend an die Arbeit von A. Huneke „Beiträge zur Symbiose von Azolla und Anabaena" (1933) hatte ich mir zur Aufgabe gestellt, einige Fragen, die dort noch offen geblieben waren, weiter zu verfolgen. Es handelt sich um die Fruktifikation der algenfreien Azollen, um die Reinkultur der Anabaena Azollae und um die Neuinfektion cyanophyceenfreier Formen.

In Bezug auf die Fruktifikation hatte A. Huneke die auffallende Beobachtung gemacht, daß die anabaenafreien Azollen in zahlreichen Kulturen unter verschiedenen Bedingungen nicht zur Fruchtbildung kamen, obwohl die Vergleichskulturen der anabaenahaltigen Pflanzen zur selben Zeit sehr reichlich Sporokarpien bildeten. Es war aber im Spätherbst noch in einem Versuchsbehälter im Garten Fruktifikation aufgetreten, ohne daß mit Sicherheit festgestellt werden konnte, ob hier nachträglich anabaenahaltige Formen eingeschleppt worden waren. Eine Klärung dieser Fruktifikationsfrage war nur mit einwandfreiem Versuchsmaterial möglich. Es wurden daher anabaenahaltige und anabaenafreie Kulturen aufgezogen, die dem gleichen Klon angehörten. Klonmaterial wurde auch benutzt, um für die Fruktifikationsversuche die besten Wachstumsbedingungen zu ermitteln. — Ein eigentümliches Ergebnis der Untersuchung von A. Huneke war ferner die Unmöglichkeit, die cyanophyceenfreien Azollen wieder mit dem Symbionten zu vereinigen. Die Versuche wurden in gleicher und neuer Form wiederholt, auch diesmal mit negativem Ergebnis. Das war um so auffallender, als in anderen Fällen, z. B. in noch nicht veröffentlichten Versuchen mit algenfreien Blasien, die Wiedervereinigung außerordentlich leicht ist. Es wurde deshalb auch der Versuch gemacht, die cyanophyceenfreien Pflanzen im Freien sich selbst zu überlassen. Hier gelang, wie unten gezeigt wird, wenigstens in einigen Fällen die Neuinfektion, allerdings ohne daß festgestellt werden konnte, unter welchen Bedingungen sie eintrat.

II.

A. Wachstumbeobachtungen an Klonen.

Im November 1930 setzte ich von Azolla filiculoides im geheizten Versuchsgewächshaus des Botanischen Gartens zu Münster 20 Klone an, die in Serien zu je 5 gruppiert wurden:

I a, b, c, d, e
II a, b, c, d, e
III a, b, c, d, e
IV a, b, c, d, e

Die Pflanzen stammten teils aus Münster, teils aus Holland. Drei der Serien (I, II, III) waren anabaenahaltig, die vierte (IV), von A. Huneke übernommen, war anabaenafrei. Der Kürze halber werden weiterhin die anabaenahaltigen Formen als Plus-, die anabaenafreien als Minusformen bezeichnet. Um gleichwertiges Ausgangsmaterial zu haben, wurden die Pflanzen so ausgesucht, daß jede nach Abtupfen mit Filtrierpapier 0,01 g wog. Ich zog die Klone auf Schlamm mit Leitungswasser in flachen Tonschalen, die unbeschattet standen. Der Schlamm stammte aus einem durchgerührten, gesiebten und gekochten größeren Vorrat, der dem sog. Castellgraben entnommen wurde, war also in allen Kulturen vollständig gleichartig[1]). Von Zeit zu Zeit wurde durch Auszählen der Pflanzen die Vermehrungsziffer in den einzelnen Kulturen festgestellt. Das Ergebnis ist in nachstehenden Tabellen zusammengestellt:

Serie I.[2])

Datum	Anzahl der Tage	Anzahl der Pflanzen in den Klonen				
		a	b	c	d	e
6. 11. 30		1	1	1	1	1
9. 12. 30	33	4	4	4	7	5
9. 1. 31	64	5	7	6	16	9
27. 1. 31	82	6	20	6	40	19

[1]) Das Auftreten von Algen bei guter Belichtung machte eine mehr oder weniger häufige Erneuerung des Kulturmediums nötig. Serienversuche, durch Zusatz von Schwermetallsalzen oder anderen Giften in verschiedenen Konzentrationen, die Algenentwicklung zu verhindern, verliefen ergebnislos.

[2]) Aus nicht näher kontrollierbaren Gründen waren Ia und Ic in der Entwicklung sehr zurückgeblieben. Sie sind deshalb in die Berechnung der Durchschnittswerte der Vermehrungszahlen nicht mit einbezogen worden.

Serie II.

Datum	Anzahl der Tage	Anzahl der Pflanzen in den Klonen a	b	c	d	e
6. 11. 30		1	1	1	1	1
9. 12. 30	33	5	5	5	4	5
9. 1. 31	64	7	12	15	15	—
27. 1. 31	83	14	23	18	29	24

Serie III.

Datum	Anzahl der Tage	Anzahl der Pflanzen in den Klonen b	b	c	d	e
6. 11. 30		1	1	1	1	1
9. 12. 30	33	5	4	7	5	7
29. 1. 31	64	14	14	22	18	19
7. 1. 31	82	42	31	50	43	46

Serie IV.

Datum	Anzahl der Tage	Anzahl der Pflanzen in den Klonen a	b	c	d	e
6. 11. 30		1	1	1	1	1
9. 12. 30	33	5	3	3	2	3
9. 1. 31	64	7	8	5	3	6
27. 1. 31	82	17	13	13	9	11

Aus den Tabellen ergibt sich für die Vermehrungszahlen der Plusformen in 82 Tagen ein Durchschnittswert von 30,77 und für die Minusformen von 12,6. Demnach war die Vermehrung der anabaenahaltigen Formen 2,44 mal so groß wie die der anabaenafreien. Die Versuche zeigen also, daß Plus- und Minusformen im Winter im warmen Gewächshaus sich in der Wachstumsintensität deutlich voneinander unterscheiden. Es wird aber weiter unten gezeigt werden, daß bei sehr warmem Wetter im Freien die Unterschiede in der Intensität des Wachstums sich sehr vermindern können. Die Versuche sind aber noch nicht einwandfrei, da die Plus- und Minusformen nicht gleichen Klonen angehörten. Es wurden deshalb aus den Klonen I d und III c zunächst vom 13. 2. 31 bis zum 22. 3. 31 nach der Methode von A. Huneke, (1933 S. 320) Minusformen auf Regenwasser gezogen.

Im März 1932 wurden 6 Klone, 3 anabaenahaltige und 3 anabaenafreie im Versuchsgewächshaus angesetzt. Je zwei anabaenafreie und zwei anabaenahaltige Pflänzchen entstammten dem Klon Id und je eine freie und eine haltige dem Klon III c. Ich bezeichne diese neuen Klone mit:

I d' +	I d —
I d' +	I d'—
III c +	III c —

Die Wachstumsgeschwindigkeit ist aus der Tabelle ersichtlich:

Datum	Tage	Id+	Id'+	IIIc+	Id—	Id'—	IIIc—
16. 3. 32		1	1	1	1	1	1
20. 4. 32	35	7	14	11	6	7	3
9. 5. 32	54	37	47	99	6	8	3

In 54 Tagen zeigten also die Plusformen eine durchschnittliche Vermehrung von 1 auf 61, die Minusformen eine auffallend geringe von 1 auf 5,6. Die Wachstumsintensität der ersteren war etwa 11 mal so groß wie die der anabaenafreien Pflanzen.

Die folgende Tabelle stellt die durchschnittlichen Vermehrungszahlen der Plus- und Minusformen im Herbst und Frühjahr dar:

Klon I d	Durchschnittswerte der Vermehrung in 54 Tagen
+Form v. 6. 11. 30	20,2
+Form v. 16. 3. 32	61
—Form v. 6. 11. 30	8,3
—Form v. 16. 3. 32	5,7

Es zeigt sich also, 1.) daß das Wachstum der Plusformen im Frühjahr erheblich schneller ist als im Spätherbst[1]), 2.) daß das Wachstum der Minusformen in beiden Jahreszeiten ungefähr gleich schwach ist und 3.), daß selbst unter günstigen Vegetationsbedingungen die Minusformen gegenüber den Plusformen eine sehr geschwächte Vegetationskraft haben. Das bedeutet aber gleichzeitig, daß die Symbiose eine wesentliche Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit oder der Bilanz des Baustoffwechsels bedingt.

B. Vergleich verschiedener natürlicher Nährböden.

Die Angaben der Praktiker über die günstigste Kulturmethode der Azollen lauten verschieden. Die einen geben Rasenerde, andere Schlamm, wieder andere gedüngte Erde als besten Nährboden an. Es wurde daher mit Klonmaterial untersucht, welcher der in Gärten gebräuchlichen Kulturmethoden das beste Wachstum ergab.

Als natürliche Nährböden wurden zuerst verwendet:

I. Schlamm mit Kuhmist, zu gleichen Teilen gemischt, und Regenwasser.
II. Rasenerde und Regenwasser.
III. Schloßgrabenschlamm und Regenwasser.
IV. Schloßgrabenschlamm und Leitungswasser.

[1]) Die Zahlen können nicht als absolute Werte angesehen werden, auf die es bei unserer Fragestellung auch nicht ankam, da das Auftreten von Algen, so lange nicht die ganze Wasserfläche von Azollen bedeckt war und dadurch die Entwicklung von Algen infolge Lichtmangels zurückgedrängt wurde, überhaupt nicht verhindert werden konnte.

In allen Kulturgefäßen (glasierte Tonschalen von 13 cm oberem Durchmesser) war die Bodenschicht (Schlamm etc.) ca. 5 cm., das Wasser ca. 4 cm. hoch, Diese Gefäße wurden im Botanischen Garten in einem ca ¾ m tief in die Erde eingesenkten Zementkasten, der in 1½ m Höhe von einem Glasdach überdeckt und auf der Westseite durch Bäume halb beschattet war, aufgestellt und in jedes aus dem Klon I d am 5. August 1931 10 anabaenahaltige Pflanzen gesetzt. Der Erfolg dieser Versuche erhellt aus folgender Tabelle:

Klon I d

Datum	Tage	Nährboden I	Nährb. II	Nährb. III	Nährb. IV
5. 8. 31		10	10	10	10
19. 8. 31	14	26	24	20	26
26. 8. 31	21	44	43	44	46

Es stellte sich also heraus, daß die Verschiedenheit der benutzten Nährböden für das Wachstum ohne Bedeutung ist und daß in allen Fällen ungefähr gleich starke Vermehrung stattfand. Verwendung von kalkhaltigem Leitungswasser schädigt das Wachstum nicht. Rasenerde ist ebenso günstig wie Schlamm. Zugabe von natürlichem Dung ist ohne Einfluß.

Es war nun weiter zu prüfen, ob Azollen, die nicht auf Wasser schwimmen sondern auf festem durchfeuchteten Substrat gezogen werden, eine Förderung oder Hemmung im Wachstum erführen. Zu dem Zweck waren am gleichen Tag (8. August) und an gleicher Stelle aus demselben Klon 50 Pflanzen auf Schlamm, der nicht von Wasser bedeckt war, gesetzt worden. Die Wuchsform war unter dieser Bedingung anders wie in Wasserversuchen. Die Azollen bildeten zusammenhängende Rasen, die meist nicht in Teilstückchen zerfielen. Das Wachstum war augenscheinlich üppiger als bei den schwimmenden Rasen, ließ sich aber wegen des schnelleren Zerfallens der letzteren nicht zahlenmäßig vergleichen.

Als sehr guter Nährboden für anabaenahaltige Pflanzen erwies sich, wie A. Huneke schon gefunden hatte, auch Sphagnum, das für Gewächshauskulturen getrocknet war und jetzt in Blumentöpfen mit Regenwasser durchtränkt wurde. Der ph-Wert des ausgepreßten Wassers betrug 4. Aus dem Klon I d am 16. 3. 31 eingepflanzte und im geheizten Versuchsgewächshaus aufgestellte Pflänzchen wuchsen bis Ende April zu außergewöhnlich großen und üppigen Exemplaren heran.

Torf ist als Nährboden unbrauchbar. Anabaenahaltige Pflanzen aus I d, die am 1. Mai 1931 auf Torfpulver gesetzt wurden, waren bis zum 19. Juni 1931 eingegangen.

C. Wachstum auf verschiedenen mineralischen Nährlösungen.

Es wurden mit Klon III c verschiedene Nährlösungen, (von der Crone, Molisch, Sachs und Knop), die z. T. schon von Oes (S. 146) und Limberger (1925), aber ohne Verwendung von Klonen, benutzt worden waren, verglichen. Die Nährlösungen waren zwar nicht gleichwertig, in allen Fällen aber war das Wachstum bedeutend schwächer als auf den natürlichen Nährmedien. Einzelheiten der Versuche brauchen daher nicht angeführt zu werden. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß alle Kulturen darin übereinstimmten, daß die Azollen ihre anfänglich lebhaft grüne Färbung langsam verloren und schließlich Plus- und Minusformen gleichartig gelbe Färbung annahmen. Am schnellsten trat die Verfärbung bei der Molisch-Nährlösung ein.

D. Wachstumsversuche mit verschiedenen ph-Werten der Molisch'schen Nährlösung und mit verschiedenen Konzentrationen der Molisch'schen, der Sachs'schen und der von der Crone'schen Nährlösung.

Da es möglich war, daß andere ph-Werte oder andere Konzentrationen der Lösungen für das Wachstum der Azollen günstiger waren oder daß bei schädigender Wirkung Minus-Formen auftraten, wurden besondere Versuche nach diesen beiden Richtungen hin angestellt.

Es wurden je drei flache Glasschalen in 1½ cm Höhe mit Molisch'scher Nährlösung von ph-Werten 4, 5, 6, 7, 8 versehen und im Institutsgewächshaus untergebracht. Jeden dritten Tag wurde die Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösungen nachgeprüft und nötigenfalls neu eingestellt. In Abständen von etwa drei Wochen wurden die Lösungen erneuert. Zur Einschränkung des Chlorophyceenwachstums waren die Gefäße wieder von unten und seitlich mit schwarzem Papier verdunkelt. In jede Schale setzte ich am 28. Oktober 1931 20 Pflanzen aus dem Klon III c. Am 5. Januar 1932 war das Aussehen der Pflanzen folgendes:

ph 4	keine Vermehrung, gelblich, bröckelig
ph 5	starke Vermehrung, gelblich, gespreizter Wuchs
ph 6	„ „ „ „ „
ph 7	„ „ „ „ „
ph 8	keine Vermehrung, gelblich, bröckelig

Die Versuche zeigen, daß die Pflanzen in Molisch-Nährlösung des Intervalls von ph 5—7 zwar gut wuchsen, sich aber wieder, wie in der normalen Lösung, gelblich verfärbten. Die Variation des ph führte also nicht zu einer Verbesserung dieser Lösung.

Die Abstufung der Konzentration oben genannter mineralischer Nährlösungen wurden in der Weise geprüft,

daß zuerst verschiedene Verdünnungsstufen, dann höhere Konzentrationsstufen verglichen wurden. Je 4 flache Glasschalen wurden mit den Nährlösungen von der Crone, Molisch, Sachs gefüllt und zwar in den Konzentrationsabstufungen einfach normal, 3/4 normal, 1/2 normal und 1/4 normal. Am 2. September 1931 wurden je drei Pflanzen aus Id auf jede Schale gesetzt. Am 12. Oktober waren sämtliche Kulturen soweit zurückgegangen und geschädigt, daß kein Zweifel bestehen konnte über die schädliche Wirkung der Verdünnung. In stärkeren Verdünnungen gingen die Pflanzen ebenfalls zugrunde.

Auch in höheren Konzentrationen der von der Crone'schen Nährlösung starben die Pflänzchen nach etwa 1 1/2 Monaten ab. Uebrigens gingen die Cyanophyceen in den hohen Konzentrationen (4 fach und 8 fach normal) noch früher zugrunde. Es war aber trotz allmählicher Ueberführung in normale Konzentration und auf Schlammwasser nicht möglich, auf diese Weise Minusformen zu erhalten. Die Versuchsgefäße waren hergerichtet wie im letztgenannten Versuch und 4 cm hoch mit Nährlösung gefüllt. Aus dem Klon Id wurden etwa 45 Pflänzchen auf jedes Gefäß verteilt. Der Versuch begann am 15. April 1931.

Aussehen der Pflanzen auf von der Crone'scher Nährlösung.

Datum	Tage	1 fach n	2 fach n	4 fach n	8 fach n
6. 5. 31	21	grün normal	grün normal	grün normal	grün, wenig Algen, Höhlenhaare deformiert
3. 6. 31	49	Algen blass	Algen blass, Azolla brüchig	gelb, brüchig d. Absterb. nahe, wenig Algen	gelb, keine Algen, Azolla am Absterben
11. 6. 31	57	sehr wenig Algen	gelb, wenig Algen	nahe d. Absterben keine Algen	eingegangen
22. 6. 31	68	eingegangen	eingegangen	eingegangen	

E. Versuch über etwaige gegenseitige Beeinflussung von anabaenahaltigen und anabaenafreien Azollen in demselben Kulturgefäß.

Um zu untersuchen, ob sich Plus- und Minusformen — vielleicht infolge Stoffausscheidung von seiten der Plusformen — in ein und demselben Kulturgefäß bezüglich des Wachstums beeinflussen, setzte ich am 1. Dezember 1930 13 anabaenahaltige Pflanzen und ebensoviele anabaenafreie zusammen in eine flache Glasschale auf Schlamm und Leitungswasser. Die Minusformen waren, wie immer im Winter, kleine,

gelbliche fast unverzweigte Pflanzen. Die Plusformen zeigten den normalen Habitus. Als Kontrollkulturen wurden in je ein gleich großes Gefäß und auf den gleichen Nährboden 26 anabaenahaltige, bzw. 26 anabaenafreie Pflanzen gesetzt. Kulturort war das geheizte Versuchsgewächshaus. Die drei Kulturgefäße standen unbeschattet, waren aber von den Seiten und von unten verdunkelt. Die untenstehende Tabelle zeigt, daß die Plusformen weder eine Hemmung noch eine Förderung im Wachstum erfuhren. Dagegen zeigten die Minusformen in der Mischkultur, bei einer Vermehrung von 13 Pflanzen auf 47, eine bedeutend schnellere Vermehrung als in der Kontrollkultur, in der nur eine Zunahme von 26 auf 66 Pflanzen stattfand.

Datum	Tage	Plus- und Minusformen vermischt	nur Plusformen	nur Minusformen
1. 12 30		13 und 13	26	26
2. 12. 30	1	17 „ 15	32	27
9. 12. 30	8	27 „ 24	62	39
15. 12. 30	14	43 „ 27	89	49
23. 12. 30	22	61 „ 47	129	66

Die anabaenafreien Pflanzen wurden also in der Wachstumsintensität durch die anabaenahaltigen gefördert. Worauf die Förderung beruht, ließ sich noch nicht feststellen.

F. Versuche durch Kultur auf stickstoffreier Nährlösung anabaenafreie Pflanzen zu erhalten.

A. Huneke gibt S. 335 an, daß es möglich sei, durch Kultur auf stickstoffreier Nährlösung anabaenafreie Azollen zu erhalten. Mit diesbezüglichen Versuchen, die ich im Institutsgewächshaus ansetzte, hatte ich keinen Erfolg. Ich verwendete abweichend von A. Huneke modifizierte N-freie Molisch'sche und von der Crone'sche Nährlösung:

I. N-freie Molisch: 1 000 g H_2O
0,25 g $MgSO_4$
0,25 g K_2HPO
Spur $FeCl_3$

II. N-freie von der Crone: 1 000 g H_2O
1 g KCl
0,5 g $MgSO4$
0,25 g $Fe_3(PO_4)_2$
0,25 g K_2HPO_4

Auf der letztgenannten Nährlösung gingen die Azollen innerhalb 6 Wochen zugrunde, wurden aber nicht frei von Cyanophyceen. Sie verloren zuerst die Seitenzweige und die älteren Blätter des Hauptzweiges. Nach und nach wurden dann die übriggebliebenen Spitzen des Hauptzweiges brüchig und zerfielen. In den sich ablösenden Blättern konnten noch farblose Cyanophyceen festgestellt werden.

Auf der N-freien Molisch'schen Nährlösung verkümmerten die Azollen auch, aber von dem Hauptzweig blieben

kleine Spitzen von 1 bis 2 mm Länge, die stark gelblich geworden waren, erhalten. Ein Zerfallen dieser Spitzen trat nicht ein. Bei mikroskopischer Durchsicht konnte festgestellt werden, daß auch sie noch Anabaenafäden enthielten, die freilich sehr blaß aussahen, aber trotz längerer Fortführung dieser Kulturen nicht zugrunde gingen. Mit variierter Beijerinck'scher Nährlösung von der Zusammensetzung: 100 g Wasser, 0,02 g K_2HPO_4[1]), wurde dann noch ein Versuch gemacht. Die Versuchspflanzen, I d+, hatten innerhalb von 3 Wochen ihre grüne Farbe verloren; sie sahen chlorotisch aus und waren wie auf den übrigen N-freien Nährlösungen Kümmerformen geworden. Cyanophyceen waren aber immer noch vorhanden.

Am 24. April 1932 benutzte ich daraufhin die gleiche Nährlösung, die A. Huneke für ihren Versuch angibt. Ich setzte etwa 70 Pflanzen aus III c auf diese Nährlösung in flachen Glasschalen ins Versuchsgewächshaus. Die Versuchsanordnung entsprach der von A. Huneke. Am 5. Juli wurde der Versuch noch einmal wiederholt, verlief aber ebenso ergebnislos, obwohl ich die Pflanzen bis zum 2. Oktober 1932 stehen ließ. Es konnte nicht geklärt werden, warum die Versuche mit denen von A. Huneke nicht übereinstimmten.

Bei allen Versuchen verkümmerten aber die Pflanzen, die älteren Blätter und Zweige starben ab, und nur die äußersten Spitze der Sprosse blieben am Leben. Wenn diese Spitzen nach etwa 3 Monaten auf den gewöhnlichen Nährboden (Schlamm mit Wasser) gebracht wurden, erholten sie sich allmählich wieder und wuchsen schließlich zu normalen cyanophyceenhaltigen Pflanzen heran. Die Versuche zeigen also wieder, wie diejenigen von A. Huneke (1. c. S. 214) und Limberger (1925) zum mindesten, daß Azollen trotz Symbiose mit Anabaena auf N-freiem Nährboden nicht normal gedeihen können.

G. Kulturen im Sommer.

Die Versuche über die günstigsten Nährböden mußten bei Beginn der Untersuchung notgedrungen im Herbst angefangen und während der Winterzeit weitergeführt werden. Während dieser Zeit können, wie vielfache Erfahrung zeigt, die Azollen überhaupt nicht zur Fruktifikation kommen, obwohl die Plusformen sich in Gewächshäusern vegetativ stark vermehren und lebhaft grüne Farbe besitzen. Zur Fruktifikation scheint außer der Wärme länger dauerndes Sommerwetter nötig zu sein. (Huneke 1. c. S.)

[1]) Beijerinck 1901. Der dort noch verwendete Erdauszug ist in meiner Lösung weggelassen.

Der Einfluß des im Jahre 1932 besonders warmen und sonnigen Wetters[1]), zeigte sich am deutlichsten bei den Minusformen. Im Winter 1931/32 bestanden diese im Gewächshaus aus kleinen, wenig verzweigten, gelblichen Pflänzchen, während die aus demselben Klon stammenden Plusformen normal grün und viel stärker verzweigt waren und bedeutend kräftiger aussahen. Nach dem Code des coleurs von Klincksiek und Valette (1908) entsprachen die Minusformen in der Färbung Nr. 282, die Plusformen Nr. 307. Auch die Vermehrung der Minusformen war im Winter minimal im Vergleich zu derjenigen der anabaenahaltigen Pflanzen. Anfang Mai 1932 wurden beide Formen ins Freie gebracht, teils in Bottiche im Botanischen Garten, teils auf den sog. Schloßgraben. (siehe Abschn. Frukt. c. I, S. 12).
Jetzt entwickelten sich die Minusformen in den Bottichen bei dem sehr warmen Sommerwetter zu kräftigen, reichlich verzweigten und fast normal grünen Exemplaren,

Neue Farbbestimmungen am 25. Juli ergaben folgendes:

Klon	in der Sonne	im Halbschatten
I d +	283	283
I d —	277	276

Die Plusformen waren also viel weniger von den Minusformen unterschieden als bei den Winterkulturen[2]). Außerdem zeigten sich die im Halbschatten stehenden Minusformen weniger gelblich verfärbt als die in voller Sonne gewachsenen. In einer halbbeschatteten Ecke des Schloßgrabens verschwand der Farbunterschied zwischen Minus- und Plusformen noch mehr. Beide Formen erschienen fast gleichmäßig dunkelgrün. Es konnte nur noch mikroskopisch mit Sicherheit festgestellt werden, welches die Plus- oder die Minusformen waren. Die Färbung bei den Plusformen entsprach durchschnittlich Nr. 303, diejenige der Minusformen etwa Nr. 327. Es kam hinzu, daß sich die Minusformen im Freien sehr kräftig entwickelt hatten und sehr reichlich verzweigt waren, also auch den Habitus der anabaenahaltigen Pflanzen aufwiesen. Es bestätigt sich damit für diese Kulturen auf dem Schloßgraben die Angabe, die Limberger für seine Pflanzen gemacht hatte, daß die beiden Formen sich so entwickeln können, daß sie äußerlich nicht zu unterscheiden sind (Limberger 1921). Dieses besondere Verhalten hängt nach unseren

[1]) Durchschnittsstatistik für Münsterland, August 1932 (Münster. Anzeiger, Blatt Nr. 987). Mittlere Temperatur 21.2°, höchste 35,5°, tiefste 9°. Heitere Tage 12, trübe Tage 4, Sommertage 15 mit 25° Wärme oder darüber, Tropentage 2 mit 33° Wärme oder darüber, Tage mit Nebel 4.

[2]) Die Farbwerte sind nur bei Vergleich der Tabelle verständlich. Da die Farben nach Schattierungen von blaugrün, graugrün usw. nummeriert sind, können die Zahlen allein keine richtige Vorstellung von der Lebhaftigkeit der Chlorophyllfärbung geben.

jetzigen Erfahrungen mit dem außergewöhnlich warmen Sommer zusammen; denn die Minusformen, die als Ausgangsmaterial der Untersuchungen von A. Huneke gedient hatten, waren einer auf demselben Schloßgraben, also unter gleichen Ernährungsbedingungen im Sommer 1928, d. h. bei kühlerem Wetter, aufgetretenen Decke von Azollen entnommen; sie waren aber alle entschieden mehr gelblich gefärbt, wie die gleichzeitig im Botanischen Garten wachsenden Plusformen. Bei meinen Kulturen vom Mai 1932 fing weiterhin zum Herbst, als das Wetter schon kühler wurde und die Pflanzen weniger helles Licht erhielten, die grüne Farbe der Minusformen an zu verbleichen und schlug allmählich von ihrem Dunkelgraugrün zu dem für die Minusformen im allgemeinen charakteristischen Gelblichgrün um.

Als die ersten kälteren Nächte kamen, erschien bei Plus- und Minusformen die schon von A. Huneke für Kälteformen als charakteristisch angegebene Anthozyanbildung. Die Plusformen bekamen einen rötlichen Farbton, bei den Minusformen blieb er mehr orangefarben. Anfang November wurden die Kulturen wieder in ein mäßig geheiztes Gewächshaus gebracht. Von jetzt ab zeigte sich ein sehr auffallender Unterschied zwischen Plus- und Minuskulturen. Die Minuspflanzen verloren ihr kräftiges Aussehen. Die älteren Blätter und Zweige starben sehr bald ab. Von allen Pflänzchen waren etwa nur noch 2 mm lange, unverzweigte Sproßspitzen vorhanden, während bei den Plusformen die ältesten Blätter sehr langsam sich verfärbten und die einzelnen Exemplare immer reichlich, wenn auch nicht mehr so üppig wie im Sommer, verzweigt blieben. In der Grün-Färbung gingen beide Formen vollständig auseinander. Auch die Anthozyanfärbung verlor sich in beiden Kulturen. Der Unterschied in der Chlorophyllfärbung ist, wenn die Farbtabellen nicht zum Vergleich vorliegen, aus den Farbnummern allein nicht ohne weiteres zu verstehen. Es sei deshalb noch angegeben, daß die Plusformen von 258 in 307 abänderten von einem Dunkelgraugrün (258) in ein lebhaftes Grün (307), die Minusformen von einem mehr gelblichen Grün (257) in einen hell grüngelben Ton (282)[1]).

Die letztere Beobachtung ist deshalb besonders wichtig, weil aus ihr wieder hervorgeht, daß die Symbiose mit Anabaena im ganzen von wesentlicher Bedeutung für die Azollen sein muß. Für die Gesamtentwicklung und für die Erhaltung der Art ist offenbar nicht das Verhalten unter günstigen Außenbedingungen im Sommer, sondern die Schädigung unter ungünstigen Verhältnissen, z. B. im Winter ausschlaggebend. Es ist kein Zweifel, daß die stark reduzierten Minusformen im Freien den Konkurrenz-

[1]) A. Huneke hatte für die Minusformen Nr. 277, für die + Formen Nr. 303 derselben Farbtafeln angegeben.

kampf mit den Plusformen nicht aufnehmen können. Freilich läßt sich aus diesen Beobachtungen noch nichts darüber entnehmen, aus welchen Gründen die Plusformen gegenüber den Minusformen im Vorteil sind.

III.

Beobachtungen über die Fruktifikation.

Nachdem durch die oben angeführten Vergleichskulturen keine besseren Kulturbedingungen als Schlamm mit Wasser oder nasser Schlamm gefunden werden konnten, wurde für alle folgenden Versuche Schlamm mit Leitungswasser verwendet; das entsprach dem natürlichen Vorkommen und war auch deshalb geboten, weil die ungeklärten Versuche von A. Huneke auch unter diesen Bedingungen angestellt worden waren. Die Versuche mußten außerdem, wie oben (S. 9) auseinander gesetzt wurde, im Freien und im Hochsommer ausgeführt werden. Verschiedenheit der Versuchsbedingungen wurden nur durch Variation der Standorte und der Kulturgefäße geschaffen. Die Hauptversuche(A) wurden in einem unbeschatteten Teil des Botanischen Gartens in Münster ausgeführt. Die Pflanzen waren hier in Bottichen von ca. 25 l untergebracht. Zur Verhinderung allzu starker Erwärmung des Wassers wurden die Bottiche so in den Boden eingesenkt, daß Wasserspiegel und Bodenoberfläche in gleicher Höhe lagen. Die Bottiche mit der Plusform und der Minusform wurden, um nachträgliche Vermischung zu verhindern, etwa 50 m voneinander entfernt im gleichen Rondell eingegraben. Sie waren ferner zum Schutz gegen Frösche, Mäuse und Vögel mit einem engmaschigen Drahtnetz (1 cm. Maschendurchmesser) bedeckt.

Für die Versuche wurde der Klon I d verwendet. Die Minusformen dieses Klons, die im Winter gezüchtet worden waren, bestanden aus ca 200 kleinen, ziemlich schwach entwickelten Pflänzchen, die Plusformen waren normal ausgebildet. Weiterhin wurden Plus- und Minusformen aus Klon I d in flachen Tonschalen mit Schloßgrabenschlamm und Wasser auf dem teilweise beschatteten, offenen Balkon des Botanischen Institutes, einmal an einer etwas sonnigen und dann an einer schattigen Stelle aufgestellt. Ferner wurden Plus- und Minusformen von I d — getrennt — auf dem Schloßgraben (B) ausgesetzt. Andere Kulturen von I d ließ ich vom 25. Juli an auf Regenfässern mit Schlamm und Wasser in Appelhülsen, 17 km von Münster, wachsen (C), und schließlich wurden I d + und I d — Formen in der Olptke, einem kleinen Fluß, der den städtischen Botanischen Garten Dortmunds durchfließt, an einer sonnigen Stelle, nahe beieinander, aber durch ein Stabgitter gegeneinander und gegen Wasservögel geschützt, aus-

gesetzt. (D) Nur im Botanischen Garten und Institut (A) konnten die Kulturen dauernd beobachtet werden.

Hier entwickelten sich die anfangs kümmerlichen Minusformen, wie schon gesagt, (s. oben S. 10) zu ziemlich kräftigen Exemplaren. Anfang August begannen die Internodien sich, ebenso wie bei den Plusformen, zu strecken. Die Blättchen wurden etwas gespreizt, sodaß die Beblätterung locker erschien. Diesen Habitus zeigen die Plusformen nach unseren Erfahrungen gewöhnlich während der Zeit, in der sie zu fruktifizieren beginnen. Tatsächlich erschienen auch die ersten Sori am 20. Juli. Die anfangs sehr reichliche, dann langsam abklingende Fruktifikation dauerte etwa bis Oktober.

Es hatte zuerst wieder den Anschein, als ob die Minusformen von (A) nicht fruktifizieren sollten. Am 29. August aber, also ungefähr zu der Zeit, bei der auch in den zweifelhaften Versuchen von A. Huneke in einem Behälter Fruktifikation stattgefunden hatte, konnten auch hier Mikro- und Makrosori festgestellt werden. Die Fruktifikation war wieder anfangs ziemlich ausgiebig, wenn auch nicht so stark wie bei den + Formen, und hörte ebenfalls anfangs Oktober auf.

Im Uebrigen bildeten sich nur noch auf dem Schloßgraben (B) Sori, auch hier sehr reichlich, aber nur bei den Plusformen. Bei den Versuchen C und D fruktifizierten auch die Plusformen nicht. Die Beobachtung, daß Azolla-Decken (Plus-Formen) sich in Bezug auf die Fruktifikation an nahe beieinander liegenden Stellen verschieden verhalten, kann man, z. B. in Holland, wo die Pflanze in den zahlreichen Poldern, Gräben und Teichen oft massenhaft auftritt, häufig machen. Es müssen außer den klimatischen Faktoren noch andere Bedingungen eine Rolle spielen, über die wir aber einstweilen nichts aussagen können. Da auch die Minus-Formen nur an einer Stelle fruktifizierten, gelten diese Sonderbedingungen offenbar auch für sie. Im ganzen kann jetzt über die Deutung des bisher fraglichen Versuchs von A. Huneke kein Zweifel mehr bestehen: Für Plus- und Minus-Formen gilt, daß sie nur bei besonders warmem Wetter zur Sporenbildung befähigt sind, daß die Sporenbildung aber auch bei warmem Wetter noch von besonderen, nicht näher bekannten Bedingungen des Substrats abhängt. Die Minus-Formen kommen jedoch auch bei sehr üppiger Entwicklung erst viel später zur Fruktifikation als die symbiontischen. Die Symbiose ist also nicht, wie es nach den Versuchen von A. Huneke scheinen konnte, Bedingung für die Fruktifikationsfähigkeit überhaupt, sondern nur für frühzeitige Sporenbildung. Es läßt sich aber noch nichts darüber aussagen, worauf das verschiedene Verhalten der symbiontischen und der nicht symbiontischen Formen beruht.

IV.

A. Untersuchungen über das Wachstum von Anabaena unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Zur Lösung der zweiten Aufgabe, art- und bakterienreine Anabaena-Kulturen zu gewinnen, war es nötig, gute Wachstumsbedingungen für Anabaena zu erhalten.

Am 5. April 1931 setzte ich Anabaenafäden, die ich aus Querschnitten von Azolla herauspräpariert hatte, auf die von A. Huneke benutzte Nährlösung, die nur aus Leitungswasser und 0,02% K_2HPO_4 bestand (ph = 7,8) und auf Molisch'sche Nährlösung (ph = 7,0). Die Lösungen wurden zu 30 ccm in je 5 Erlenmeyerkölbchen von je 100 ccm Inhalt gefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Die Kulturen stellte ich ins Versuchsgewächshaus an eine Stelle, die gegen direktes Sonnenlicht geschützt war. 8 bis 10 Wochen dauerte es, bis man Wachstum beobachten konnte, aber dann trat schnelle Vermehrung ein. Die Algenfäden krochen an den Gefäßwänden herauf, durchspannten in einigen Kulturen spinnwebartig die ganze Nährlösung und bildeten nach 3 bis 4 Wochen auf der Oberfläche zusammenhängende Watten, die von Zeit zu Zeit (nach etwa je 4 Wochen) in frische Lösung übertragen wurden. Die mikroskopische Untersuchung ergab artreines Material in allen Kölbchen. Die Länge und Breite der Zellen im Vergleich zu Anabaenazellen, die neu aus den Blatthöhlen und den Vegetationspunkten herauspräpariert wurden, zeigt unten stehende Tabelle in Durchschnittswerten aus mehreren Messungen:

	Anabaena aus Blättern	Anabaena v. Vegetationsp.	Anabaena aus d. Kölbchen
gewöhnliche Zellenlänge	9,58	6,00	7,7
gewöhnliche Zellenbreite	5,28	4,29	4,98
Heterocystenlänge	9,38	8,5	7,6
Heterocystenbreite	7,24	6,6	6,75

Es waren also zwar Größenunterschiede zwischen den Zellen am Vegetationspunkt und in den Blatthöhlen vorhanden, worauf schon Limberger und Huneke (l. c. S. 212) aufmerksam gemacht hatten, aber die Fäden der Kulturen stimmten mit denjenigen am Vegetationspunkt fast genau überein. Im ganzen Habitus, sowie in der Gestalt der einzelnen vegetativen Zellen und der Art der Heterocystenbildung waren im übrigen alle drei Formen nicht zu unterscheiden.

Da die Cyanophyceen fast stets an den Gefäßwänden emporwuchsen, ehe sie sich in der Flüssigkeit ausbreiteten, versuchte ich diese Eigentümlichkeit für die Kultur dadurch auszunützen, daß ich in Reagenzgläser bis zur halben Höhe

chemisch reine Glaswolle[1]) hineinbrachte. Diese wurden ganz mit K_2HPO_4-Lösung[2]) bedeckt und sterilisiert. Der Versuchsort war der gleiche wie im ersten Versuch. Wieder dauerte es 8 Wochen, ehe sich Wachstum zeigte. Aber dann war in 2 Wochen die Oberfläche der zylindrischen Glaswollfüllung ganz mit Algen bedeckt. Wie die mikroskopische Untersuchung und die Bestimmung ergaben, lag wieder artreines Anabaena—Azollae—Material vor.

Es war mir aufgefallen, daß die Algen in allen Kulturen nur an der belichteten Seite wuchsen. Deshalb setzte ich anfang August 1930 einige Anabaena-Röhrchen dem direkten Sonnenlicht aus. Aber schon nach einigen Tagen waren die Kulturen gelb und zerstört; die Algen gedeihen also nur in diffusem Tageslicht.

Zu einem dritten Versuch füllte ich einige Petrischalen mit einer flachen Schicht Quarzsand und durchtränkte diesen mit K_2HPO_4-Lösung. Die Schalen wurden in der gewöhnlichen Weise sterilisiert. Auf den Quarzkörnchen entwickelten sich die Cyanophyceen mindestens ebenso gut wie auf den Glasfäden.

Von den Quarzsandkulturen impfte ich am 7. Oktober 1931 einige mit Algenfäden umwickelte Körnchen, auf Agarplatten, die hergestellt waren aus:

1000 g H_2O
0,2 g K_2HPO_4
18 g Agar

[1]) Gewöhnliche Glaswolle ist unbrauchbar.
[2]) 0,02 % K_2HPO_4 in Leitungswasser.

Die Kulturen standen im geheizten Versuchsgewächshaus. Am 14. Oktober waren die Algenzellen zu charakteristischen Locken-Kolonien (Fig. 1) ausgewachsen. Am 29. impfte ich Proben von den äußersten Spitzen der Locken auf frische Agarplatten über. Wie sich zeigte, wurde das Wachstum durch Wärme sehr begünstigt. Deshalb wurden die Kulturen weiterhin im Warmhaus bei ca 30° C aufbewahrt. Nach drei Wochen hatten sie eine beträchtliche Größe erreicht.

Es ist auffallend, daß die K_2HPO_4-Lösung, die von A. Huneke ursprünglich zur Gewinnung von Rohkulturen verwendet worden war, so üppiges Wachstum ermöglichte. Das erklärt sich aber z. T. daraus, daß in dem Münsterischen Leitungswasser alle nötigen Mineralbestandteile, wenn auch — abgesehen von Ca — in sehr geringen Mengen, vorhanden sind. Das Wasser enthält nach Angaben der hiesigen landw. Versuchsstation vom Jahre 1926:

Abdampfrückstand	617,2—680 mg	im Ltr. Wasser	CaO_2 (gebunden)	169—176 mg	im Ltr. Wasser
Ca O	197,6—240 „		Cl	42,5—49 „	
Mg O	23,6—24,6 „		N_2O_5	5,0—9,0 „	
Mn	0,08—0,0 „		Gesamthärte	16,1—23,2 „	
Eisen	0,1—0,14 „		Karbonathärte	9,6—10,8 „	
SO_3	175—213 „		Bleibende Härte	6,5—12,4 „	

Das Cl ist fast vollständig an Na gebunden.

Durch besondere Versuche wurde festgestellt, daß in aq. bidest.+K_2HPO_4 normale Vermehrung der Cyanophyceen nicht mehr stattfindet. In je drei Duran- und Jenaer Kölbchen mit K_2HPO_4 Merk, pro analysi und aq. bidest. (Fitting'scher Destillierapparat) vermehrte sich jedesmal eine etwa schrotgroße Cyanophyceenkugel nur noch auf das Doppelte bis 4 fache zu blassen kugeligen Kolonien. Mikroskopisch ergab sich, daß ein großer Teil der Fäden zerfallen, andere krankhaft verkleinert oder vergrößert waren. Nur wenige Fäden hatten noch normales Aussehen. Es war augenscheinlich, daß die Ernährung unter diesen Umständen nicht ausreichte. Man kann daher aus der günstigen Entwicklung in den K_2HPO_4 Leitungswasser-Lösungen schließen, daß Anabaena Azollae mit sehr wenig Mineralstoffen, vor allem mit Spuren von Stickstoff gut gedeihen kann, daß die Alge oligonitrophil ist.

B. Reinkulturen von Anabaena.

Die Methode des Ueberimpfens führte ich systematisch weiter. Von Zeit zu Zeit wurden dem Rande der Kulturen

Proben entnommen und in Bouillon auf Bakteriengehalt geprüft. Die Bouillon bestand aus:

10 g Liebigs Fleischextrakt
20 g Pepton
5 g NaCl
(im Autoklaven sterilisiert)

Die Bouillonröhrchen wurden bei 30° im Thermostaten aufbewahrt. Nach 48 Stunden zeigte sich jedesmal üppige Bakterienentwicklung, Kokken und bewegliche Stäbchen.

Am 20. Februar 1932 blieb ein Bouillonröhrchen steril. Zur weiteren Kontrolle dieser Kultur impfte ich zwei andere Reagenzgläser, von denen das eine mit Ashby's Nährlösung[1]) versehen war, das andere mit Mannitlösung (2% Mannit, 0,02% K_2HPO_4, 100% H_2O). Nach 48 Stunden Aufbewahrung bei 30° war auch jetzt kein Bakterienwachstum festzustellen. Auch in der zugehörigen Algenkultur waren mikroskopisch keine Bakterien zu entdecken. Von dieser Stammkultur wurden jetzt die Cyanophyceen auf Schrägagarröhrchen (Agar mit K_2HPO_4-Lösung wie oben) übertragen und, nach jedesmaliger Kontrolle auf Reinheit, (wie oben) alle 14 Tage auf frische Röhrchen weitergeimpft. Am 2. Mai besaß ich 50 Reinkulturen von Anabaena. Das Wachstum der bakterienfreien Cyanophyceen war genau so gut wie das der Rohkulturen. Es bildeten sich dichte blaugrüne Locken, die die Schrägfläche des Agars oberflächlich überzogen. Bei längerer Aufbewahrung der Agarröhrchen (etwa 4 Wochen) durchzogen die Algen wie feine Fäden auch das Innere des Nährsubstrats.

V.

Versuche, anabaenafreie Azollen künstlich mit Anabaena zu infizieren.

Ebenso wie bei A. Huneke verliefen die Versuche, anabaenafreie Azollen mit der isolierten Anabaena künstlich zu infizieren, vollkommen ergebnislos. Da die Schwierigkeit einer Neuinfektion für Azolla charakteristisch zu sein scheint, sollen trotz des negativen Ausgangs die einzelnen Versuche doch kurz erwähnt werden. Es wurden:

a) an anabaenafreien Pflanzen die Vegetationspunkte entfernt und die ausgestochenen Spitzen mit Anabaenafäden bedeckt. Die Anabaenen wurden in diesem und den folgenden Versuchen aus Rohkulturen entnommen, da ein steriles Arbeiten doch nicht möglich war, weil die Azollen selbst nicht steril waren[2]).

---

[1]) Nährlösung Ashby: Leitungswasser 100 ccm, Mannit 1,2 g, K_2HPO_4 0,02 g, $MgSO_4 \cdot 7Aq$ 0,02 g, $CaSO_4 + 2Aq$ 0,01 g, $CaCO_3$ 0,51 g.

[2]) Versuche, die Azollen mit H_2O_2 (Mameli und Polacci 1910), oder Chlorkalk zu sterilisieren, verliefen ergebnislos.

Die neu gebildeten Seitenzweige wuchsen in die Anabaenafäden hinein, nahmen aber keine Algenzellen auf.

b) die jungen Blätter der Knospen, soweit als möglich, mit Nadeln auseinandergebogen, in die Spalten über dem Vegetationspunkt Anabaenafäden hineingeschoben und die Knospenblätter wieder geschlossen.

c) Querschnitte von anabaenahaltigen Blatthöhlen auf die Vegetationspunkte der freien Pflanzen gelegt, in der Erwartung, daß die Anabaenafäden aus den Blatthöhlen eventuell besser für Infektionen geeignet wären als die kultivierten Algen.

d) Querschnitte von Blatthöhlen der Plusform mittels einer feinen Nadel in die Vegetationspunkte der Minusform hineinpraktiziert.

e) Schiffchen aus Glimmer und Hollundermark auf Molisch'scher Nährlösung verfertigt. Auf die Glimmerplättchen legte ich artreine Anabaenahäute und setzte mitten in sie hinein anabaenafreie Azollen, sodaß die Vegetationspunkte ganz eingegraben waren. Die Azollen wuchsen, nahmen aber keine Algen auf.

f) bei sonst gleicher Versuchsanordnung wie in e) zerkleinerte Glaswolle mit Anabaenafäden reichlich vermischt auf die Schiffchen gebracht.

g) anabaenafreie Azollen auf eine Quarzsandschicht gesetzt, die völlig mit Anabaena Azollae bewachsen und von Schlamm unterschichtet war. Außerdem wurden täglich mittels eines Pinsels Anabaenafäden auf die Vegetationspunkte aufgetragen.

h) die Vegetationspunkte mit Wattefäden, die mit Anabaena durchzogen waren, umwickelt. Zuweilen wurde mit den Wattefäden auch noch zerkleinerte Glaswolle gemischt.

i) Schließlich wurde versucht, die Infizierung von den Blatthöhlen aus zu erreichen. Mit Hilfe einer feinen Nadel wurden Algenfäden unter die Oberblätter anabaenafreier Azollen gebracht, oder die Blatthöhlen wurden seitlich angeschnitten und mit Anabaenafäden oder in anderen Fällen mit Querschnitten der Plusform beimpft.

VI.

Versuche über Neuinfektion im Freien.

Der negative Ausfall der Versuche zur künstlichen Neuinfektion der Minusformen beweist natürlich nicht, daß eine Wiedervereinigung der Symbionten überhaupt nicht möglich, sondern höchstens, daß sie sehr schwierig ist. Es war denkbar, daß bei einer Entwicklung der Azollen im Freien, die Bedingungen für die Einwanderung der Anabaenen in die Blatthöhlen günstiger lagen. Es wurden daher alle Minus-Kulturen immer wieder kontrolliert. Tatsächlich zeigte sich bei dem Versuch C (Appelhülsen) (cf. S. 12) im Spätherbst 1932, daß die meisten Exemplare des ausgesetzten Klons Id— Cyanophyceen in den Blatthöhlen enthielten. Es wurde mir versichert, daß die beiden Vergleichsklone Id + und Id — gegen nachträgliche Vermischung geschützt gewesen waren. Da aber doch keine dauernde Aufsicht möglich gewesen war, konnte ich nicht wagen, diesen Versuch als einwandfrei anzusehen. Aehnlich war es mit dem Versuch D in Dortmund. Hier wurde unter den Minusformen ein Exemplar

gefunden, das größtenteils mit Anabaena infiziert war, aber noch einige cyanophyceenfreie Aestchen aufwies. In allen übrigen Versuchen waren die Minusformen unverändert geblieben.

Ich setzte daher Ende Mai 1933 an den oben (S. 12) genauer bezeichneten Stellen A, B, C und D neue Versuche an. Da die Minusformen, mit denen ich 1932 gearbeitet hatte, im Winter 32/33 zugrunde gegangen waren, mußte ich einen neuen Klon benützen, der erst im April 1933 anabaenafrei geworden war. Es konnten daher nur kleine, kaum verzweigte Pflänzchen ausgesetzt werden. In Dortmund (D) entwickelten sich diese anfangs gut. Später gingen sie aber stark zurück, da sie infolge des Absinkens des Wasserspiegels zu stark ausgetrocknet waren. Eine Neuinfektion trat diesmal nicht ein. Auch in Appelhülsen (C), wo die Pflänzchen, wie im Herbst zuvor, zu kräftigen grünen Exemplaren heranwuchsen, konnte diesmal keine Einwanderung von Anabaenen festgestellt werden. Die Bottiche im Botanischen Garten (A) habe ich im Sommer und Herbst 1933 fortwährend unter Beobachtung gehabt. Der Behälter mit den Minus-Formen stand mindestens 50 m von allen anderen Kulturen entfernt und war, wie schon gesagt, durch ein enges Drahtnetz nach oben gesichert. Eine Vermischung mit Plus-Formen war hier ausgeschlossen. Da eine sehr starke Entwicklung von Chlorophyceen nicht verhindert werden konnte, blieben die Pflänzchen sehr klein. Mitte September setzte ich sie daher in einen anderen Bottich, der noch nicht zur Kultur von Azollen benützt war, unmittelbar neben den ersten, nachdem die Azollen sorgfältig aus den Algenwatten herauspräpariert waren. Nun wuchsen die Pflänzchen sehr lebhaft und erreichten bald normale Größe. Gegen Ende Oktober wurde eine ähnliche Farbenänderung bemerkbar wie bei den Kulturen im Juli 1932. Die Pflanzen verloren die gelbliche Färbung, wurden mehr grau-grün und waren jetzt kaum mehr von den Plus-Formen zu unterscheiden. Zwei Exemplare waren aber noch etwas dunkler als der Durchschnitt und stimmten auch in Größe und Gestalt mit den normalen überein. Die mikroskopische Kontrolle ergab, daß diese beiden Exemplare mit Anabaenen infiziert waren. In dem Rest der Kultur konnten keine cyanophyceenhaltigen Exemplare mehr gefunden werden. Auf Grund des dreimaligen Auftretens einer Neuinfektion der Minusformen kann, wenn auch nur im dritten Fall einwandfreie Beobachtungen vorliegen, jetzt mit Sicherheit behauptet werden, daß eine spontane Wiedervereinigung der Symbionten möglich ist. Daß sie künstlich bis jetzt nicht gelungen ist und spontan nur selten stattfindet, zeigt, daß die Vegetationspunkte, von denen aus normalerweise die Infektion der jungen Blatthöhlen vor sich geht, durch den dichten Zusammenschluß

der Knospenblättchen besonders gegen die Einwanderung von außen geschützt sind. Das ist insofern ökologisch von Bedeutung, als dadurch verhindert wird, daß fremde Organismen (andere Cyanophyceen, Diatomeen, etc.), die sich nach Garjeanne (1928, S. 102) zuweilen in den Blattohren von Blasia finden sollen, in die Blatthöhlen von Azolla eindringen. In der Tat wurden niemals andere Mikroorganismen als Anabaena Azollae — Bakterien ausgenommen — als Raumparasiten festgestellt, obgleich viele hunderte von Blatthöhlen untersucht worden waren.

Zusammenfassung.

1). Zur Durchführung der Untersuchungen wurde Klonmaterial gezogen und je von einem Klon cyanophyceenfreie (Minusformen) gewonnen.

2). Bei Nachprüfung der gärtnerischen Kulturmethoden mit Klonmaterial zeigte sich kein Unterschied zwischen Ueberschichtung von Schlamm mit Leitungswasser oder Regenwasser.

3). In allen geprüften künstlichen Nährlösungen (Sachs, Molisch, Knop, von der Crone) war das Wachstum schlechter als auf Schlammwasser. Durch Variation des ph und Variation der Konzentration nach der niederen oder höheren Seite ließ sich keine Verbesserung dieser Lösungen erreichen.

4). Ganz normale Entwicklung ist nur im warmen Sommer möglich. Die Kulturen gedeihen auch in bewegter Luft dann im Freien besser als in der ruhigeren feuchten Gewächshausluft.

5). Bei warmem, sonnigem Wetter und Freilandkulturen können die Minusformen sich in Chlorophyllgehalt und Habitus den Plusformen so annähern, daß sie nur mikroskopisch sicher zu erkennen sind.

6). Im Winter gehen die Minusformen im warmen Gewächshaus viel stärker zurück als die Plusformen. Sie werden chlorotisch und sterben bis auf die äußersten Spitzen der Hauptsprosse ab.

7). Im allgemeinen sind also die Minusformen durch das Fehlen des Symbionten stark geschwächt.

8). Der Symbiont, Anabaena Azollae, konnte art- und bakterienrein gezogen werden.

9). Er wächst monatelang kräftig auf einer Nährlösung, (oder auf Nähragar) mit 0,02% K_2HPO_4 als einzigem Zusatz zu Leitungswasser, ist also jedenfalls oligonitrophil und kommt mit außergewöhnlich geringen Mineralsalz-Konzentrationen aus.

10. Eine künstliche Neuinfektion cyanophyceenfreier Azollen gelang ebenso wenig wie bei den Versuchen von A. Huneke.

11. Bei Kultur im Freien wurde dagegen in einigen Fällen Neuinfektion festgestellt.

12. Die Schwierigkeit der Neuinfektion schützt die Azollen vor dem Eindringen unberufener Gäste in die Blatthöhlen.

Vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. Westf. ausgeführt und von der Philosophischen Fakultät als Dissertation angenommen. Eine angenehme Pflicht ist es mir, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Hannig für seine freundliche Hilfe und die vielen Anregungen, die er mir hat zuteil werden lassen, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen. Ebenso fühle ich mich verpflichtet, Herrn Prof .Dr. Benecke für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und die freundliche Ueberlassung eines Arbeitsplatzes im Botanischen Institut zu danken.

Literaturverzeichnis.

1. Beijerinck, M. W. 1901 Ueber oligonitrophile Mikroben Ctrbl. f. Bakt. **7.** S, 561.
2. Esmarch, F. 1914 Untersuchungen über die Verbreitung der Cyanophyceen auf und in verschiedenen Böden Hedwigia **55.** S. 224—273.
3. Garjeanne, A. J. M. Das Zusammenleben von Blasia mit Nostoc. Annales Byologici I, 1928, 102—108.
4. Harder, R. **1917** Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich an Nostoc punktiforme. Zeitschr. f. Bot. **9.** S. 145—236.
5. Huneke, A. **1933** Beiträge zur Symbiose von Azolla und Anabaena. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 20 III, Breslau S. 315—341.
6. Klincksiek et Valette 1908 Code des coleurs. Paris.
7. Limberger, A. **1921.** Zur Frage der Symbiose der Anabaena mit Azolla. Anz. d. Wien. Akad. math,-nat, Kl. **58** S. 131—133.
8. Ders. **1922.**. Neuere Ergebnisse der Symbioseforschung Verh. d. zool.-bot. Ges. i. Wien, **12** S. 635,
9. Ders. **1925.** Zur Frage der Symbiose von Anabaena mit Azolla II, Sitzgsber. d. Akad. d. Wiss., Wien, math.-nat. Kl., Abtlg. I, **134** S. 1—5
10. Mameli und Polacci **1910** Metodo di sterilizazione di piante vive per esperienze di patologia e fisiologia. Rendic. Acad. Lincei **19,** II, S. 569.
11. Märtens, H. 1914. Das Wachstum der Blaualgen in mineralischen Nährlösungen, Cohn's Beiträge **12.** S. 439.
12. Miehe, H. 1917/19 Weitere Untersuchungen über die Bakteriensymbiose von Ardisia crispa. Jahrb. f. wiss. Bot. **58.** S. 29.
13. Molisch, H. 1926 Mitteilungen über die Symbiose der beiden Lebermoose Blasia pusilla L. und Cavicularia densa St. mit Nostoc. Bot. Beobachtungen in Japan. The Science Reports of the Tohoku Imperial Univ. Fourth Series Biologie **1.**
14. Oes, A. Ueber die Assimilation des freien N durch Azolla. Zeitschr. f. Bot. 1913 Bd. **5.** S. 145.
15. Pringsheim, E G. 1918. Zur Physiologie endophytischer Cyanophyceen. Archiv für Protistenkunde 38 S. 126.

16. Schröder, M. 1932 Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. Ztrlbl. f. Bakt., Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abt. II. 85 S 175—212.
17. Straßburger, Ueber Azolla. Leipzig 1873.

Lebenslauf.

Am 7. Mai 1906 wurde ich als Tochter des Rektors Klemens Wildemann zu Münster i. Westf. geboren. Nach Absolvierung der vier Grundschuljahre besuchte ich das Lyzeum und die realgymnasiale Studienanstalt der Annette Droste-Hülshoff-Schule zu Münster i. W. und legte Ostern 1926 die Reifeprüfung ab. Ostern 1927 bestand ich das Abschlußexamen des Seminarjahrs am Oberlyzeum der Ursulinen zu Osnabrück und studierte dann an der Universität zu Münster Naturwissenschaften. Von Herbst 1930 bis Februar 1933 war ich mit vorliegender Arbeit beschäftigt.